AUSLÖSUNG ÖRTLICHER VERKALKUNGEN DURCH INJEKTION VERSCHIEDENER METALLSALZE ("DIRECT CALCIFIERS" NACH SELYE) AN DER SUBKUTIS DER RATTE

Anita Bauer

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0053

AUS DEM PHARMAKOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(Direktor: Professor Dr. M. Kiese)
UND AUS DER KONSERVIERENDEN ABTEILUNG
DES ZAHNÄRZTLICHEN INSTITUTS DER UNIVERSITÄT BERN
(Leiter: Professor Dr. A. Schroeder)

AUSLÖSUNG ÖRTLICHER VERKALKUNGEN DURCH INJEKTION VERSCHIEDENER METALLSALZE ("DIRECT CALCIFIERS" NACH SELYE) AN DER SUBKUTIS DER RATTE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der Zahnheilkunde
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anita Bauer

aus Wolfach

München 1968

G. Bauknecht, Dissertations-Druckerei, 8 München 8, Zeppelinstr. 79, Tel. 458195

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. R. von Werz
Mitberichterstatter:	Professor Dr. A. Schroeder
Dekan:	Professor Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 23.1.68

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSÜBERSICHT

Seite

I. EINLEITUNG 7
Sind Dystrophie und exogenes Calciumangebot für eine örtliche Gewebsverkalkung notwendig?
Die Bedeutung der Calcergie für die Zahnheilkunde

II. EXPERIMENTELLER TEIL 10

Injektion verschiedener anorganischer Verbindungen in die Rattensubkutis

A. Material 10
Verwendete Substanzen und Herstellung der Lösungen

B. Methodik 11
Behandlung der Tiere und Verarbeitung der Präparate

III. ERGEBNISSE 13

A. Makro- und mikroskopische Befunde nach Injektion von

1. Bleiverbindungen 13
2. Kaliumpermanganat 23
3. Kupferverbindungen 25
4. Zinkchlorid 28
5. Seltenen Erden 29
6. Calciumverbindungen 34

B. Statistische Auswertung 43
C. Anhang 46
Triamcinolonzusatz

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 50

V. ZUSAMMENFASSUNG 53

VI. LITERATURVERZEICHNIS 54

I. EINLEITUNG

Während es lange Zeit als sicher galt, daß die akzidentelle Eröffnung einer Pulpa zwangslaufig zum Untergang dieses Organs führt, ist diese pessimistische Ansicht in neuerer Zeit durch gewisse Beobachtungen erschüttert worden.

Heute ist es ein zentrales Anliegen der konservierenden Zahnheilkunde, nach akzidenteller Eröffnung einer Pulpa im Verlaufe präparativer Maßnahmen womöglich einen Reparationsvorgang mit Verschluß des Defektes durch Sekundärdentin zu erreichen. Da man solche Vorgänge gelegentlich spontan, vorzugsweise in der Umgebung zurückgebliebener Dentinspäne, ablaufen sah, ist es verständlich, daß man bestrebt war, den Vorgang der Hartsubstanzbildung durch Wahl geeigneter Überkappungsmittel zu fördern bzw. auszulösen. De facto leitete die Einführung von Kalkverbindungen, in erster Linie von Calciumhydroxyd (Calxyl®, Reogan®), einen wichtigen und erfolgreichen Abschnitt in der Zahnheilkunde ein.

Bei der Anwendung von calciumhydroxyd-haltigen Überkappungsmitteln wird man von der Vorstellung geleitet, daß ein erhöhtes exogenes Angebot an Calcium-Ionen sowie die Schaffung einer aseptischen Nekrose auf Grund der Ätzwirkung (pH=12) mit Ausbildung einer narbigen Bindegewebszone und anschließender Kalkeinlagerung, Voraussetzung ist für die nachfolgende Apposition von Sekundärdentin durch Odontoblastentätigkeit. Die Kalkeinlagerung, die bei den günstigsten Fällen zu beobachten ist, wurde dabei mehr oder weniger als Sonderfall der den Pathologen schon lange geläufigen "dystrophischen Verkalkung" gewertet.

Unter diesen Umständen ist es gerade vom zahnärztlichen Standpunkt aus außerordentlich interessant, daß 1962 durch Versuche von SELYE [21, 22] ein ganz neues Licht auf Verkalkungsvorgänge im Organismus fiel. SELYE fand als Fazit zahlreicher Beobachtungen, daß der Begriff der "dystrophischen Verkalkung" für sehr viele Fälle anscheinend nicht zutreffend ist. Er unterscheidet zwei Formen der Verkalkung: die Calciphylaxie und die direkte Verkalkung: Calcergie. Bei der ersteren kommt es nach Vorbehandlung mit einem calciummobilisierenden Stoff (von SELYE als "sensitizer" bezeichnet) durch Injektion eines auslösenden Stoffes (challenger) innerhalb einer gewissen "kritischen Zeit" an der Injektionsstelle oder - nach intravenöser Injektion - in bestimmten Organen zu Verkalkungen, denen keine nachweisbaren entzündlichen oder nekrotischen Erscheinungen vorausgehen sollen. Ebenso tritt bei der "direkten Verkalkung" (Calcergie) schon nach der alleinigen Injektion bestimmter Stoffe ("direct calcifiers") eine örtliche, scharf umgrenzte Bindegewebsverkalkung

gleichfalls "ohne nennenswerte Gewebsschädigung im Sinne von Entzündung oder Nekrose" auf.

Diese Auffassungen müßten, sofern sich die zugrunde liegenden Beobachtungen bestätigen sollten, vom Gesichtspunkt des Zahnarztes aus ein großes theoretisches wie möglicherweise auch praktisches Interesse wecken, sofern es demnach Verkalkungsvorgänge gibt, die weder eine Nekrose noch eine Erhöhung des Calcium-Gefälles zur Voraussetzung haben. In diesem Zusammenhang muß daran erinnert werden, daß von zahnärztlicher Seite bereits 1952 der Zweifel ausgesprochen worden war, ob die Sekundärdentinbildung der eröffneten Pulpa nicht auch ohne ein exogenes Kalkdepot zustande kommen kann (SAUERWEIN [19]). Die Voraussetzung einer örtlichen Nekrose sei ja bereits durch das Bohrtrauma gegeben.

Nach alledem müssen für den Zahnarzt jene Stoffe interessant sein, welche SELYE unter einer außerordentlich großen Anzahl geprüfter Substanzen auch ohne hormonelle blut-calcium-erhöhende Vorbehandlung (ohne "Sensibilisierung") verkalkend wirksam fand, weshalb er ihnen den Namen "direct calcifiers" gegeben hat.

Im Hinblick auf die große Zahl der von SELYE untersuchten Verbindungen ist es eine relativ sehr kleine Anzahl von Stoffen, denen diese Wirkung zukommt. Es sind im wesentlichen:

$BiCl_3$	$CuSO_4$	Pb-Acetat
Ca-Acetat	$Ga(NO_3)_3$	$PbCl_2$
$CaCl_2$	$Ga_2(SO_4)_3$	$Pb(NO_3)_2$
$CdCl_2$	$InCl_3$	Pb-Subacetat
$CeCl_3$	$KMnO_4$	$ZnCl_2$
CsCl	K_2MnO_4	$ZnSO_4$
Cu-Acetat	$LaCl_3$	Zn-Salicylat
$Cu(NO_3)_2$	$NaMnO_4$	Äthanolaminoleat

In seinem 3-Quaddel-Test injizierte SELYE jeweils der gleichen Ratte 2 mg; 0,2 mg; 0,02 mg von diesen Stoffen in je 0,2 ml Wasser gelöst oder aufgeschwemmt unter die Rückenhaut und beobachtete dann nach spätestens 7 Tagen verschieden starke Verkalkungen der Subkutis.

Wir haben die nach SELYE wirksamsten dieser Substanzen herausgegriffen, einmal, um ihre Wirkung aus eigener Anschauung kennenzulernen, zum anderen, um gegebenenfalls die verkalkende Wirkung zu vergleichen mit dem in der Zahnheilkunde zu Überkappungszwecken bisher erfolgreichsten und daher überwiegend angewandten Calciumhydroxyd, welches von SELYE leider nicht untersucht worden ist. Neben dem Calciumhydroxyd, das uns wegen seiner überragenden praktischen Bedeutung gewissermaßen als Bezugssubstanz diente, wandten wir in der SELYE'schen Versuchsanordnung noch vier weitere Calcium-Verbindungen an, einmal, weil es gewebsfreundlichere Verbindungen sein sollten, um den Faktor der beim $Ca(OH)_2$ komplizierenden Ätzwirkung zu vermindern, andererseits, um die örtliche Calciumionenkonzentration durch Verwendung von Calcium-Verbindungen sehr verschiedener Löslichkeit zu variieren.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

Injektion verschiedener anorganischer Verbindungen in die Rattensubkutis

A. MATERIAL

Bei unseren Versuchen wurde folgende Stoffauswahl verwendet:

$PbCl_2$	$LaCl_3$
$Pb(NO_3)_2$	$InCl_3$
$Pb(CH_3COO)_2$	$CeCl_3$
$Cu(NO_3)_2$	$KMnO_4$
$Cu(CH_3COO)_2$	$ZnCl_2$

Außerdem folgende Calciumverbindungen:

$CaCl_2$	$Ca(OH)_2$
$Ca(CH_3COO)_2$	$CaSO_4$.
$Ca(NO_3)_2$	

Von allen diesen Substanzen wurden im allgemeinen, soweit möglich, isomolare Lösungen in den Konzentrationen: 0,1; 0,01; 0,001-molar geprüft. Sie wurden im Autoklaven sterilisiert. Die Substanzen, deren Lösungen beim Erhitzen ausfallen, wurden steril mit aqua bidest. angesetzt. Die Stoffe, die sich in der hohen Konzentration nicht im Wasser lösen, injizierten wir wie SELYE als Suspension.

Abweichend hiervon verfuhren wir nur im Falle des schwerlöslichen Bleichlorid und Calciumsulfats. Da wir von beiden keine homogene Suspension erhalten konnten, haben wir vom Bleichlorid, weil wir das Injektionsvolumen, von 0,2 ml nicht erhöhen und auch keinen viskösen Stoff von unbekanntem Einfluß verwenden wollten, nicht die äquimolaren Mengen von 5,56; 0,56; 0,056 mg appliziert, sondern nur 0,2 ml der bei Zimmertemperatur gesättigten Lösung von - in diesem Fall - 0,96 %, d.i. maximal knapp 1/3 der 0,1-molaren Menge.

Ähnlich war es bei Calciumsulfat. Dieses löst sich nur zu 0,27 % in Wasser, weshalb also nur der jeweils 6,38te Teil der äquimolaren Menge von 3,44;, 0,34;, 0,034 mg injiziert wurde.

Zu Beginn der Versuche haben wir die Substanzen an einigen Tieren auch in der SELYE'schen Dosierung (2 mg, 0,2 mg, 0,02 mg) geprüft. Soweit dies der Fall war, haben wir die betreffenden Ergebnisse jeweils am Ende der Tabellen separat aufgeführt.

B. METHODIK

Die verwendeten Ratten (Stamm: FORSTER, Fa. Wander AG., Bern) erhielten eine Standarddiät definierter Zusammensetzung (Rattenwürfel der NAFAG Gossau S.G.). Sie wurden durch beidseitiges Rasieren vorbereitet, nach Desinfektion mit 70 %igem Alkohol wurden an den beiden Flanken die drei Konzentrationen von jeweils zwei verschiedenen Substanzen, und zwar nie in der gleichen Kombination, verabreicht, kaudal die höchste Konzentration, kranial die niedrigste. Die Dosen der injizierten Substanzen lagen in allen Fällen weit unterhalb der in der Literatur angegebenen letalen bzw. mittleren letalen Dosen (zwischen 1/5oo bei Lanthan und 1/12 bei Kupfer).

Die verschiedenen Lösungen wurden auch von uns subkutan so injiziert, daß sie unterhalb der derben, leicht verschieblichen Haut in das dort sehr lokkere Bindegewebe zwischen Hautmuskelschicht und Muskelfaszie deponiert wurde.

Jede Substanz wurde jeweils in 3 Dosen mindestens an 6 Tieren getestet. Bei nicht signifikantem Ergebnis wurde die Versuchszahl bis auf zehn erhöht. Nach 6 - 8, (im Mittel 7) Tagen wurden die Ratten durch Inhalieren von Äther getötet und die Rückenhaut abgezogen. Soweit sich charakteristische Plaques entwickelt hatten (siehe Abbildung 1), was bei wirksamen Substanzen innerhalb dieses Zeitraumes stets der Fall war, wurden sie mit durchscheinendem Millimeterpapier ausgemessen, in der Mitte durchtrennt und die eine Hälfte in Formalin, die andere in Alkohol fixiert. Aus jeder Substanzreihe wurde mindestens eine Plaque, meist die der höchsten Konzentration entsprechende, histologisch untersucht. Die in Formalin fixierten Hautstücke wurden nach Einbettung in Paraffin mit Hämotoxilin-Eosin gefärbt. Bei den in Alkohol fixierten Hautstücken wurde zum Nachweis von Calcium-Einlagerungen die Färbung mit Silbernitrat nach v. KOSSA durchgeführt.

Bei unseren Versuchen mit Kalkverbindungen beschränkten wir uns auf die Untersuchung von $Ca(OH)_2$ und $CaSO_4$ sowie der schon von SELYE geprüften Verbindungen (s. o.).

Im folgenden führen wir nun die Ergebnisse unserer Versuche, nach Substanzgruppen getrennt, mit den dazu gehörigen Tabellen an. Im ganzen wurden 115 männliche und weibliche Ratten mit einem Gewicht zwischen 125 und 440 g behandelt. Während wir anfänglich nur junge weibliche Ratten bis 200 g Körpergewicht verwenden zu dürfen glaubten, gingen wir bald auch zur Verwendung älterer und männlicher Tiere über, weil sich uns im Gegensatz zu SELYE zeigte, daß die Wirksamkeit der Substanzen nicht auf weibliche Ratten bis 200 Gramm beschränkt war, wie dies aus unseren Tabellen ersehen werden kann.

III. ERGEBNISSE

A. MAKRO- UND MIKROSKOPISCHE BEFUNDE NACH INJEKTION VON

1. Bleiverbindungen

Was ihre örtlichen Effekte betrifft, die uns vornehmlich interessieren, haben die Bleisalze nach FLURY [6] adstringierende Wirkung, sind äußerlich sekretionshemmend, austrocknend, gefäßverengend und entzündungswidrig, wobei den leichter löslichen Salzen Bleinitrat und Bleiacetat eine etwas stärkere Wirkung zukommt. Über ältere Literatur betr. Lokalwirkung bei subkutaner Injektion siehe weiter unten.

Die Wasserlöslichkeit der von uns verwendeten Bleisalze beträgt:

$Pb\text{-}Cl_2$	0,961	Gewichts%
$Pb(NO_3)_2$	34,3	"
$Pb\text{-}(CH_3COO)_2$	43,5	"

Nach BUCK und KUMRO [2] überleben Ratten die subkutane Injektion von 330 mg Bleinitrat pro kg zwar wochenlang, jedoch unter Zeichen allgemeiner Vergiftungserscheinungen und lokaler Nekrosen. Nach intraperitonealer Injektion von 130 mg Bleiacetat pro kg starben Ratten meist innerhalb von 2 Tagen.

Makroskopische Lokalwirkungen von Bleisalzen

Bei insgesamt 30 Ratten haben wir die oben genannten Salze des Bleis injiziert. Schon wenige Tage nach der Injektion konnte man durch die Palpation flache Verhärtungen der Kutis feststellen, die den tieferen Schichten der Haut angehörten und mit dieser verschieblich waren. Durch die rasierte Rattenhaut waren in vielen Fällen bereits makroskopisch diese scheibenförmigen Verhärtungen als weißlich durchscheinende Bezirke erkennbar. Nach dem Abziehen der Haut waren diese Plaques als scharf umgrenzte, weiße, mehr oder weniger kreisförmige, die Innenseite der Haut als Verdickung überragende Bezirke noch deutlicher erkennbar, sodaß ihre Ausmessung keinerlei Schwierigkeiten bereitete. Aus der beigegebenen Abbildung 1 geht die Abhängigkeit ihres Umfanges von der applizierten Menge deutlich hervor.

Abb. 1: Innenseite der Rückenhaut mit drei verkalkten Quaddeln (Blasen) nach Injektion von Bleiacetat. Dosis von links (kaudal) nach rechts (kranial) 0,1-molar, 0,01-molar, 0,001-molar entsprechend 7,58 mg; 0,76 mg und 0,076 mg.

Bei den höchsten Konzentrationen, bei denen diese Plaques, soweit vorhanden, ihre stärkste Ausprägung erfahren hatten (0,1-molar, kaudales Depot) gewann man den Eindruck, daß sich um das Injektionsdepot eine Art Blase oder Zyste mit serösem bis galltertigem Inhalt gebildet hatte, deren Innenseite leuchtend weiß war. Beim Abziehen der Haut ließ sich die "Blase" meist als Ganzes ablösen, jedoch war in manchen Fällen die der Rückenmuskulatur zugekehrte Wand mit dieser verwachsen und blieb deshalb beim Abziehen auf ihr haften. Manchmal war, auch wenn sich die "Blase" mit der Haut unversehrt ablösen ließ, auf dem ihr korresponierten Bezirk der Muskelfaszie noch eine weißliche Streifung derselben als verstärkte Zeichnung von deren Bindegewebsfibrillen zu erkennen, als Ausdruck dessen, daß hier die Verkalkung über die "Kapsel" hinaus bis auf die Muskelfaszie übergegriffen hatte.

Auch bei stärkster Ausbildung der Plaques haben wir Hautnekrosen bei den Bleiverbindungen nie beobachtet, wie dies bei den später zu schildernden Verbindungen zum Teil der Fall war.

Mikroskopische Veränderungen

Beim Bleiacetat fanden wir wie SELYE unterhalb der quergestreiften Hautmuskelschicht schwarz angefärbte Faserzüge, die auf Imprägnierung der kollagenen Fasern mit Kalkpartikeln schließen lassen. Im darunterliegenden, sehr blutreichen, lockeren Bindegewebe wurden zahlreiche Fibroblasten gefunden, die feine und feinste Kalkkörnchen enthielten.

Die Färbung mit Hämatoxilin-Eosin zeigte bei Bleiacetat eine verminderte Querstreifung der Hautmuskelschicht, ein interstitielles Ödem in der Subkutis mit Auflockerung der kollagenen Fasern. Darunter wies das Bindegewebe eine starke lymphohistiozytäre Infiltration sowie prall gefüllte Gefäße auf, als deutliche Anzeichen einer Gewebsreizung, wie sie schon in der älteren Literatur beschrieben wurde (s.u.). Unsere Konzentrationen waren allerdings mit Ausnahme des Bleichlorids mehr als dreimal höher als die von SELYE angewandten.

Noch intensiver als beim Bleiacetat erwiesen sich die Kalkeinlagerungen in die subkutanen Bindegewebszüge nach Injektion von Bleinitrat. Auch die Entzündungserscheinungen waren hier stärker, was sich besonders im Auftreten von kleineren Nekrosen des kollagenen Bindegewebes zeigte (s. Abb. 2).

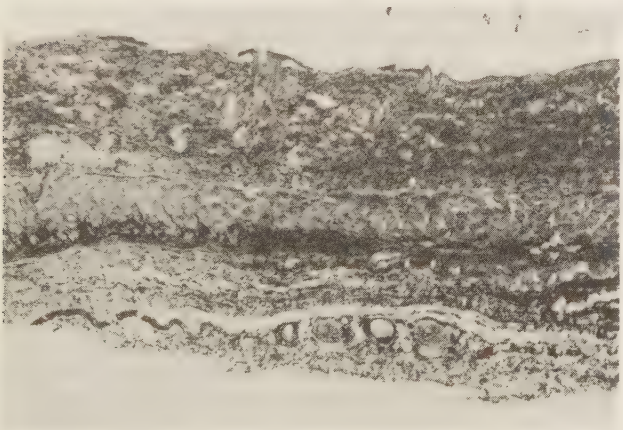

Abb. 2: Querschnitt durch die Rückenhaut der Ratte 7 Tage nach subkutaner Injektion von Bleinitrat (0,1-molar-6,62 mg). Vergrößerung 18 x, Kalkfärbung nach v. KOSSA; Kalkeinlagerung in die kollagenen Gewebe unterhalb der Hautmuskelschicht (Pfeil).
Das gleiche Präparat zeigt bei HE-Färbung deutliche Entzündungserscheinungen, vgl. Text.

Eine besonders intensive Verkalkung des kollagenen Bindegewebes trat beim schwerlöslichen Bleichlorid auf, die ebenfalls mit starken Entzündungserscheinungen, in den tieferen Lagen des subkutanen Gewebes sogar mit Nekrose verbunden war (Abb. 3 und 4). Die Dosen entsprechen hier etwa den von SELYE angewandten.

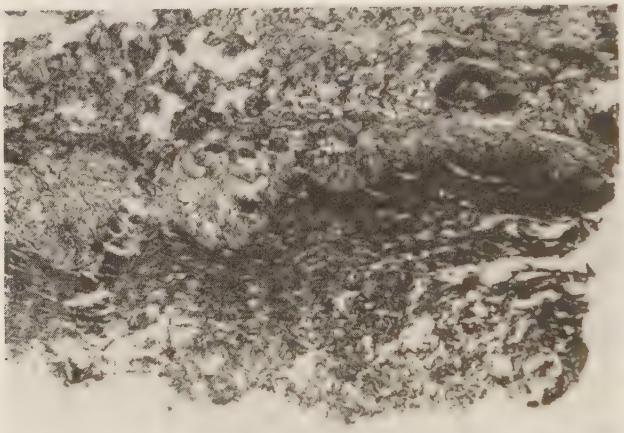

Abb. 3: Wirkung von Bleichlorid (0,035-molar = 1,92 mg) subkutan. Die Schwarzfärbung unterhalb der Hautmuskelschicht läßt starke Kalkeinlagerungen erkennen. Darunter seröse Durchtränkung. Kalkfärbung nach v. KOSSA, Vergr. 33 x.

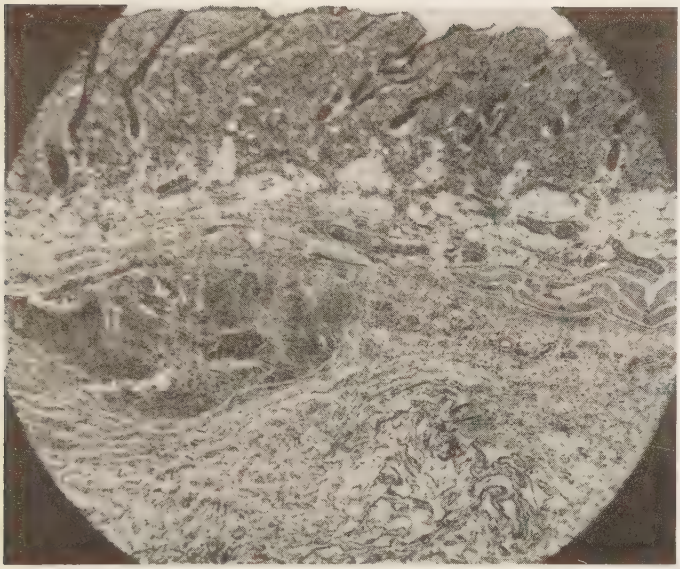

Abb. 4: Bleichlorid, Schnitt durch die gleiche Quaddel in H. E. -Färbung in der gleichen Vergrößerung. Unter der Hautmuskelschicht starke Entzündungserscheinungen, massive Zellinfiltrate, beginnende Einschmelzung, umliegende seröse Durchtränkung.

Ältere Beobachtungen über lokale Gewebswirkungen von Bleisalzen

Es ist von mehr als bloß historischem Interesse, daß die auffallenden Veränderungen nach Injektion von Bleiacetat, wie wir sie eben geschildert haben, schon frühzeitig beobachtet und - bezeichnenderweise von einem Pathologen - beschrieben worden sind. Im Anschluß an die subkutane Injektion 1 %iger Lösung von Bleiacetat bei Kaninchen, die zum Studium der Bleivergiftung vorgenommen wurde, beobachtete KUMITA [15] bereits im Jahre 1909 derbe Infiltrationen der Injektionsstelle, die im Gegensatz zur Angabe noch älterer Autoren der voraseptischen Ära keine Abszesse darstellten. Über ihr makroskopisches Bild berichtet er: "Beim Berühren mit dem Finger empfing man deutlich den Eindruck, daß sich zwischen die dadurch holprig emporgehobene Hautdecke und die darunter liegende Muskelschicht eine harte Masse von wachsender Mächtigkeit eingeschoben hatte". Bei der Sektion stellten sich "durch blendend weißes Aussehen und knochenähnliche Härte auffallende Bezirke" heraus, deren Entstehung

KUMITA damit erklärt, "daß das von der Bleilösung durchtränkte Gewebe erst der Nekrose, bald auch der Verkalkung anheimgefallen ist". Im Zentrum der Veränderungen beobachtete KUMITA ganz wie wir die Bildung einer "Höhle", deren Inhalt der Hauptsache nach "aus einer klaren, schwach gelblichen Flüssigkeit von ansehnlichem Eiweißgehalt"besteht. KUMITA hat die Entstehung dieser Höhle genau verfolgt, indem er zu verschiedenen Zeitpunkten histologische Schnitte anfertigte. Einen Tag nach der Injektion fand er noch keine Kalkeinlagerungen, dagegen starke Injektion der Gefäße und eine Auflockerung des Fasergewebes, "offenbar infolge reichlicher Durchtränkung mit seröser Flüssigkeit". Nach zwei Tagen war das Bindegewebe in beginnendem Zerfall begriffen, die Bildung eines Spaltraumes, dessen Rand eine Zone kleinzelliger Infiltrationen zeigte, setzte ein. Um diese Zeit fand er erste Zeichen einer Kalkablagerung. Nach vier Tagen war die Tendenz zur Höhlenbildung deutlich zu erkennen, was sich bis zum sechsten Tage immer klarer herausstellte. Die histologischen Untersuchungen ergaben, daß "die ursprünglichen Gewebsbestandteile teils durch weißliche Einlagerungen auseinandergedrängt, teils selber in solche übergegangen waren". Das Substrat der Einlagerungen bildeten "die ursprünglich welligen, jetzt straff faserig gewordenen Bindegewebsbündel des stratum subcutaneum". KUMITA spricht von zwei Bestandteilen, aus denen sich die Veränderungen um die Höhle herum zusammensetzen. Einmal bestehen sie "aus einem im Vergleich zur Norm strafferen Fasergewebe" mit verringerter Färbbarkeit. Zwischen den zu Bündeln vereinigten Fibrillen und auch in deren Substanz befinden sich Kalkeinlagerungen. Das Gewebe zwischen den Bündeln ist aufgelockert, "entweder infolge seröser Durchtränkung oder einer kleinzelligen Infiltration, die übrigens in der Regel nur leicht ist". Den anderen Bestandteil bildet "ein an Zellen sehr reiches, an Interzellularsubstanz armes Junggewebe". Den Kalknachweis führte KUMITA mit Salzsäure und mit der Hämatoxilin-Eosin-Färbung, bei der sich Kalk blau färbt.

Fast ein Jahrzehnt früher hatte aber bereits v. KOSSA [14] ebenfalls an Kaninchen Verkalkungserscheinungen innerer Organe beschrieben, nach zum größten Teil subkutaner Injektion verschiedener Metallsalze und organischer Verbindungen und im Zusammenhang damit gleichzeitig die später nach ihm benannte Silbernitratfärbung zum Nachweis von Kalkeinlagerungen entwickelt. Von KOSSA hat insgesamt etwa 50 organische und anorganische Verbindungen nach meist subkutaner Injektion auf ihr verkalkende Wirkung in den Nieren untersucht, fand dabei allerdings relativ wenige wirksam. Er stellte dabei fest, daß chemisch verwandte Stoffe "mit Bezug auf ihr

biologisches Verhalten voneinander wesentlich verschieden sein können". Die über einige Tage injizierten Substanzen riefen in den Nieren oder in der Leber eine Verkalkung hervor, welche umso intensiver ausfiel, je chronischer der Verlauf der Vergiftung war. Ebenso spielt die individuelle Empfindlichkeit eine Rolle für das Zustandekommen und die Intensität der Verkalkung. Das Calcium liegt dabei zum größten Teil als Calciumphosphat vor. Den Mechanismus der Verkalkung erklärt v. KOSSA mit einer Funktionsstörung oder Gewebsveränderung, auf Grund deren das Calcium in Kristallform ausfällt.

Vergleich verschiedener Bleisalze

Den oben auf S. 13 beschriebenen makroskopischen Veränderungen liegen unsere Beobachtungen an Bleiacetat zugrunde. Sie gelten aber qualitativ genauso auch für die Veränderungen, wie wir sie nach Bleinitrat bzw. Bleichlorid sahen. Nach Ausweis der Tabellen 1 - 3 müssen wir in Übereinstimmung mit SELYE alle drei Bleisalze zu den wirksamsten Verkalkungsstoffen rechnen, insofern als 19 von 20 Ratten relativ große Verkalkungszonen auch noch bei der 0,01-molaren Lösung zeigten, sogar die 0,001-molare Lösung hat noch in 17 von 30 Fällen erkennbare Verkalkungen hervorgerufen. Mit der schwächsten Konzentration wurden zur Sicherung der Signifikanz zehn weitere Injektionen durchgeführt.

Tabelle 1: Bleiacetat

Beim Bleiacetat waren die Ergebnisse besonders gleichmäßig, verglichen mit den übrigen Bleisalzen (Tabelle 2 u. 3). In dieser Hinsicht war ein Vergleich der Ergebnisse von SELYE (siehe letzte Zeile d. Tabelle), abgesehen von der höheren Dosierung in unseren Versuchen, am ehesten möglich.

Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen:						
Tier Nr.	7,58 mg (0,1m)	0,758 mg (0,01m)	0,076 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung n. Tagen
1	143	56	0	♀	250	7
2	206	136	1	♀	320	8
3	147	87	0	♀	190	8
4	200	95	22	♀	190	7
5	240	86	46	♂	315	7
6	250	60	25	♀	190	7
7	375	120	50	♂	300	14
	2 mg (1%)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
8	290	52	0	♀	185	6
Zum Vergleich: Mittelwerte bei SELYE:						
	201	113	66	♀	100	6

Tabelle 2: Bleinitrat

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 6,62 mg (0,1m)	0,66 mg (0,01m)	0,066 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	375	90	0	♀	300	5
2	214	100	0	♀	190	8
3	214	91	28	♂	400	7
4	259	145	19	♀	190	8
5	350	100	0	♀	300	7
6	-	-	41	♀	110	7
7	-	-	2	♂	210	7
8	-	-	31	♂	210	7
9	-	-	54	♀	145	7
10	-	-	40	♂	145	7

- bedeutet: keine Injektion mit dieser Dosis

Zum Vergleich: Mittelwerte bei SELYE:

346	181	19	♀	100	6

Tabelle 3: Bleichlorid

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 1,92 mg (0,035m)	0,192 mg (0,0035m)	0,019 mg (0,0035m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	196	51	1	♀	320	7
2	240	45	7	♂	400	7
3	140	0	0	♂	265	7
4	100	25	0	♀	190	8
5	280	53	1	♀	190	7
6	225	54	0	♀	190	7
7	200	60	14	♀	145	6
8	-	-	0	♀	145	7
9	-	-	0	♂	145	7
10	-	-	0	♀	110	7
11	-	-	6	♂	210	7
12	-	-	0	♂	210	7

- bedeutet: Keine Injektion mit dieser Dosis

Mittelwerte bei SELYE:

221	102	78	♀	100	6

Berücksichtigt man die viel niedrigere molare Konzentration, in der das $PbCl_2$ angewendet wurde (die höchste Konzentration entspricht beinahe der mittleren Konzentration von Bleinitrat und -acetat), so erscheint die verkalkende Wirkung des $PbCl_2$ jener der anderen Bleisalze eher überlegen.

2. Kaliumpermanganat

Die Permangansäure gehört zur Gruppe der hochoxydierten Säuren, die durch Sauerstoffabgabe wirken. Im Vergleich zu anderen Manganaten tritt bei ihren Salzen die Manganwirkung zurück, da das Mn hier im anionischen Rest der Permangansäure enthalten ist. Mit der Oxydationswirkung kann eine adstringierende, bei parenteraler Injektion sogar eine ätzende Wirkung verbunden sein. Auf der Oxydation beruht seine therapeutische Anwendung, z. B. zur Desinfektion von Schleimhäuten, zu Magenspülungen, als Antidot oxydabler Gifte sowie zur früher geübten subkutanen Umspritzung von Schlangenbissen. In Gegenwart oxydabler Verbindungen, daher auch bei subkutaner Injektion, wird es rasch zu MnO_2 reduziert. Der gleiche Vorgang erfolgt spontan bei verdünnten Lösungen (LANGECKER [16]), was uns bei den Versuchen anfänglich Schwierigkeiten bereitete. Wir haben deshalb später stets frische, steril angesetzte Lösungen ohne vorhergehende Erhitzung im Autoklaven verwendet.

Die tödliche Dosis für Ratten bei subkutaner Injektion wird mit mehr als 600 mg pro kg angegeben (MUNTSCH [18]).

Von SELYE wurden außer $KMnO_4$, $NaMnO_4$ und K_2MnO_4, die er stark wirksam fand, auch Manganate ($MnCl_2$, $MnSO_4(NH_4)_2SO_4$, $Mn(NO_3)_2$ auf ihre verkalkende Wirkung geprüft, wobei diese Verbindungen aber unwirksam waren. Die Verkalkung provozierende Eigenschaft scheint also keine Manganwirkung zu sein.

Makroskopische Veränderungen

Die Versuche mit Kaliumpermanganat standen am Anfang unserer Studien, wo wir noch über wenig Erfahrung verfügten. In einer ersten Tiergruppe, die wir zur Orientierung ansetzten, fanden wir bei zwei von vier Tieren die erwartete Verkalkung. In einer zweiten Gruppe waren die Ergebnisse, obwohl wir nur weibliche Ratten unter 200 Gramm einsetzten, vorwiegend negativ, was, wie wir heute vermuten müssen, auf Verwendung von im Autoklaven erhitzter und dadurch zum Teil zersetzter Lösung beruhte. Charakteristisch war bei dieser Gruppe, daß sich im Bereich der höchsten Konzentration besonders prall gefüllte, kugelig vorstehende Blasen entwickelten, die wie sonst mit klarer seröser Flüssigkeit gefüllt waren, deren Innenwandung jedoch nicht die sonst übliche weiße, sondern eine schmutzig-braune Färbung aufwies, die vermutlich durch Braunsteinablagerung bedingt ist. Ähnliche Beobachtungen machte HARNACK [9] schon im Jahr 1901 nach subkutaner Injektion von $KMnO_4$ an Kaninchen.

Erst die frisch angesetzte, nicht erhitzte Lösung führte dann bei der dritten Gruppe, bestehend aus allerdings durchweg jungen Tieren bis 150 Gramm,

zu Verkalkungen von noch größerem Umfang als bei SELYE beschrieben, möglicherweise dem Umstand entsprechend, daß die von uns verwendeten isomolaren Mengen um die Hälfte größer als bei diesem Autor waren (3,16 mg gegenüber 2,00 mg). Wir fanden hier ähnlich wie bei den Bleisalzen blasenartige, scharf begrenzte, grauweiße Verdickungen, aus denen sich seröse Flüssigkeit entleerte.

Tabelle 4: Kaliumpermanganat

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 3,16 mg (0,1m)	0,316mg (0,01m)	0,032 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	300	105	9	♂	150	6
2	-	90	10	♀	150	6
3	300	80	0	♀	150	6
4	315	115	20	♂	150	6
5	380	-	-	♀	120	7
6	340	-	-	♀	120	7
7	-	-	0	♂	185	7
8	-	-	13	♂	190	7
9	210	-	0	♀	200	7
10	-	-	0	♂	210	7
11	-	-	0	♂	420	7
Mittelwert bei SELYE:	232	201	82	♀	100	6

Mikroskopische Veränderungen

Die mikroskopische Betrachtung dieser Präparate zeigt starke Verkalkung der subkutanen Bindegewebsfaserzüge, die in unmittelbarer Nähe der Hautmuskelschicht ziemlich dicht parallel gelagert und reichlich mit Fibroblasten durchsetzt waren. Es schloß sich nach innen zu eine infolge seröser Durchtränkung locker strukturierte Schicht an, der wieder eine Parallelanordnung der verkalkten Fasern folgte. In dieser schichtweisen Verkalkung kann man zweifellos die Vorstufe einer "Blasenbildung" erblicken, wie sie oben beschrieben wurde.

3. Kupferverbindungen

Die zweiwertigen Salze des Kupfers, von denen SELYE das Acetat, das Nitrat und das Sulfat schwach, das Kupferchlorid dagegen unwirksam fand, gelten auf Grund ihrer eiweißfällenden Wirkung in der Medizin als geschätzte Adstringentien bzw. unverdünnt als Ätzmittel. Auf der reizenden Wirkung konzentrierter Lösungen, z. B. von Kupfersulfat beruht u. a. die emetische Wirkung. Wegen der schlechten oralen Resorption ist Kupfer toxikologisch praktisch nicht interessant. Die intravenöse Zufuhr toxischer Dosen führt zu Kapillar- und Leberschädigungen. Ob erstere mit der verstärkten Ausschüttung von Hypophysenhinterlappen-Hormon zusammenhängt, die im Tierversuch nach i.v. Injektion nachgewiesen wurde (HAUSCHILD [11]), muß dahingestellt bleiben. Diese Hinweise seien jedoch wegen der Nekrosen erwähnt, die wir bei den Kupferversuchen beobachteten. Als tödliche Dosis von Kupfersulfat subkutan werden für das Kaninchen 0,05 Gramm pro kg angegeben (EICHHOLTZ [4]).

Makroskopische Veränderungen

Zu den Ergebnissen unserer Versuche mit Kupfer ist zu bemerken, daß die Tiere entsprechend dem höheren Molekulargewicht der Verbindung etwa die doppelte Menge erhalten haben wie bei SELYE. Dementsprechend waren die Verkalkungsbezirke sowohl beim Acetat als auch beim Nitrat durchschnittlich größer als bei diesem Autor. Ferner traten deutliche Verkalkungen auch noch in der mittleren 0,01-molaren Verdünnung auf. Erst die 0,001-molare Lösung erwies sich uns als unwirksam. Qualitativ zeigten die Versuche als Eigentümlichkeit Hautnekrosen über den stark verkalkten Bindegewebsbezirken, sodaß es zur Entwicklung einer schon makroskopisch auffallenden Schorfbildung, offensichtlich als Ausdruck von Ernährungsstörungen dieser Hauptpartien, kam. Die subkutanen Verkalkungen zeichneten sich durch ihre blendend weiße Farbe, ihre scharfe Abgrenzung gegen die Umgebung und durch besonders derbe Konsistenz aus.

Tabelle 5: Kupferacetat

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 3,99 mg (0,1m)	0,399 mg (0,01m)	0,004 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	100	100	0	♀	300	6
2	184	0	0	♂	400	7
3	363	101	0	♂	265	7
4	100	55	0	♀	190	8
5	90	55	0	♀	190	7
	2 mg (1 %)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
6	184	44	0	♀	175	6
	Mittelwert bei SELYE:					
	153	0	0	♀	100	6

Tabelle 6: Kupfernitrat

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 4,72 mg (0,1m)	0,47 mg (0,01m)	0,047 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	261	173	0	♀	210	7
2	39	0	0	♀	250	7
3	220	46	0	♀	190	8
4	185	47	0	♀	190	7
5	180	100	0	♂	400	7
6	225	115	0	♀	190	7
7	2 mg (1 %)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
7	300	39	0	♀	100	6
	Mittelwert bei SELYE:					
	75	0	0	♀	100	6

Mikroskopische Beobachtungen

Bei den Kupfersalzen trafen wir bei der histologischen Betrachtung auf intensive subkutane Faserverkalkung, welche von entzündlichen Erscheinungen, wie Anschoppung der Gefäße, Zellinfiltration und seröse Durchtränkung mit teilweiser Atrophie der Hautmuskelschicht begleitet war.

4. Zinkchlorid

Zink- und Kupfersalze haben nach EICHHOLTZ [5] zahlreiche gemeinsame Eigenschaften. Auch Zinksalze werden in der Medizin als Ätzmittel verwendet; sie vermögen Eiweißlösungen zu fällen. Die Vergiftungserscheinungen sind vor allem lokaler Natur. Nach subkutaner Injektion letaler Dosen an der Ratte beobachteten HAHN und SCHUNK [7] im Laufe einer Woche Hautnekrosen. Auch bei jeder anderen Applikationsform gab es, wie zu erwarten, Nekrosen im Bereich des Kontaktes. Bei subkutaner Zufuhr von Zinkchlorid beträgt die DL 50 fur Ratten 500 mg pro kg.

Makroskopische Beobachtungen

Während bei SELYE das Zinkchlorid auch in der mittleren und sogar noch in der schwächsten Lösung verkalkend wirksam war, stand bei unseren Versuchen die Reizwirkung im Vordergrund: Nach Injektion der 0,1-molaren Lösung (=2,72 mg) war in drei von fünf Fällen deutliche Rötung der Subkutis mit kleinen Hämorrhagien und einmal eine opake Trübung festzustellen, dagegen fanden wir hier nie Verkalkungen. In weiteren zwei Fällen jedoch, wo Zinkchlorid in der etwas niedrigeren Menge von 2 mg wie bei SELYE verabreicht worden war, entstanden weiße Plaques sehr geringen Umfangs.

Tabelle 7: Zinkchlorid

Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen:						
Tier Nr.	2,72 mg (0,1m)	0,27 mg (0,01m)	0,027 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
	0	0	0	♀	250	7
	0	0	0	♂	450	7
	0	0	0	♂	450	7
	(105[X])	0	0	♀	205	7
5	0	0	0	♂	245	7
	2 mg (1 %)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
6	27	0	0			
7	15	15	0			

Zu Tabelle 7: x = opake Trübung ohne scharfe Grenze

Histologisch sahen wir aber auch hierbei Hyperämie und Rundzelleninfiltrate als Zeichen von Entzündung. Entsprechend der niedrigen Gesamtdosis (ca. 1/250 der DL 50) traten keine resorptiven Giftwirkungen (Zinktremor) auf.

5. Seltene Erden

Es ist auffallend, daß sich unter den von SELYE als besonders stark wirksam befundenen Elementen, die doch eine kleine Auswahl aus einer großen Gruppe geprüfter anorganischer Verbindungen darstellten, gleich drei Vertreter der zur dritten Elementengruppe zu rechnenden Seltenen Erden befinden. Unter diesen sogenannten Lanthaniden fiel die Wirksamkeit in der Reihe $LaCl_3$ > $CeCl_3$ > $InCl_3$ ab. Doch hat SELYE, wie erwähnt, nicht isomolare Mengen, sondern jeweils 2 mg als Höchstdosis gegeben. Wir haben in der höchsten Dosierung $LaCl_3$ 7,7 mg, $CeCl_3$ 4,8 mg und $InCl_3$ 4,42 mg injiziert, also gut das Doppelte, vom Lanthan fast das Vierfache.

Chloride und Nitrate der Seltenen Erden sind in Wasser gut löslich und haben desinfizierende und adstringierende Wirkung. "Bei subkutaner Injektion kommt es häufig zu starken örtlichen Erscheinungen: Hyperämie, Blutungen und Gewebszerstörungen" (STEIDLE [24]). Wegen ihrer schlechten enteralen Resorption sind die Salze der Seltenen Erden für Warmblüter relativ ungiftig. Die Lanthanide vermögen besonders in mittleren Konzentrationen Eiweißlösungen zu fällen, so daß die Zellschädigung nicht in allen Fällen direkt abhängig von der Konzentration ist. Nach HARA [8] können manchmal hohe Konzentrationen geringere Zellschädigungen bewirken als schwächere Lösungen. Nach diesem Autor kann $CeCl_3$ Hühnereiweiß (1:1000 in Ringerlösung) nur in Verdünnungen von mehr als 1:50 fällen. Von einer Konzentration von 1:40 an findet nach diesem Autor keine Eiweißfällung mehr statt. (Die von uns verwendete Höchstkonzentration betrug 1:42).

Als kleinste tödliche Dosis für subkutane Injektion von $LaCl_3$ gibt AJAZZI-MANCINI [1] bei weißen Mäusen 3,5 g pro kg an. Diejenige für $CeCl_3$ beträgt nach HARA für Ratten 2 - 4 g pro kg. Die letale Dosis von Indiumsulfat beträgt nach HESSE [13] für Ratten bei subkutaner Zufuhr 0,15 g pro kg.

Makroskopische Veränderungen bei Lanthanchlorid, Indiumchlorid, Ceriumchlorid

Während Lanthanchlorid in den Versuchen von SELYE offensichtlich Verkalkungen in allen Verdünnungen ergab, deren Durchmesser sich anscheinend eindeutig bestimmen ließ, konnten wir mit der 0,1-molaren Verdünnung bei vergleichsweise fast vierfacher Menge lediglich diffuse Veränderungen beobachten, deren Ausdehnungen sich nur unter großem Vorbehalt zahlenmäßig ausdrükken ließen (dementsprechend eingeklammerte Werte in Tabelle 8) Diese Losung ergab eine eben erkennbare opake Aufhellung der Subkutis. Von einer weissen Verfärbung wie bei den anderen Verkalkungsstoffen konnte nicht die Rede sein. Manchmal war die Veränderung erhaben und von gallertiger Konsistenz. Die Außenseite der Haut war in einigen Fällen nekrotisch geworden. Nur in einem Falle ergab auch die mittlere 0,01-molare Lösung eine graue Induration geringen Umfangs.

Tabelle 8: Lanthanchlorid

Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen:						
Tier Nr.	7,7 mg (0,1m)	0,77 mg (0,01m)	0,077 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	(350)	0	0	♀	190	8
2	(80)	0	0	♀	190	7
3	(200)	0	0	♀	320	7
4	(280)	(72)	0	♂	315	7
5	(200)	0	0	♀	300	6
6	(410)	-	-	♂	185	7
7	(480)	-	-	♂	190	7

Werte eingeklammert, da keine scharfe Begrenzung der Trübungen vorhanden.

- bedeutet: Keine Injektion mit dieser Dosis

Etwa Ähnliches wie über das Lanthan ist über die Wirkung des Indiums zu sagen, der SELYE und Mitarbeiter eine eigene Veröffentlichung widmeten (23). Hier ergab sich in der 0,1-molaren Konzentration nur diffuse, wenn auch sehr ausgebreitete Trübung bei sechs von acht Tieren. Bei den anderen beiden Tieren war diese Trübung nicht mit Sicherheit zu erkennen. Die Muskelschicht schien wie von einem grünlichen Schleier bedeckt. Auch war die Haut über der Injektionsstelle in großem Umfange der trockenen Nekrose verfallen bzw. verschorft. Die Veränderung der äußeren Haut zeigten gewisse Ähnlichkeit zu den beim Lanthan beschriebenen, doch waren sie nie erhaben.

Tabelle 9: Indiumchlorid

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion in Dosen: 4,42 mg (0,1m)	0,442 mg (0,01m)	0,044 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	(745)	0	0	♀	210	7
2	(526)	0	0	♀	250	7
3	(700)	0	0	♀	190	8
4	(0?)	0	0	♀	190	7
5	(0?)	0	0	♀	190	8
6	(560)	0	0	♀	250	5
7	(740)	-	-	♂	420	7
8	(1050)	-	-	♂	210	7

Werte eingeklammert, da nur schwache Trübungen zu erkennen waren.

- bedeutet: Keine Injektion mit dieser Dosis.

Die makroskopischen Veränderungen bei Ceriumchlorid nehmen eine Mittelstellung ein zwischen den früher geschilderten Veränderungen der ausgeprägten Verkalkungsstoffe und der für Lanthan und Indium charakteristischen, so ganz andersartigen Erscheinungen. Wir fanden beim Cer meist deutlich umschriebene, teils weiße, teils graue trübe, blasenartige Indurationen in der Subkutis. Vielfach waren die Quaddeln von einem schmalen, roten Hof umgeben. Gelegentlich konnten bei den hohen Dosen auf der Außenseite der Haut im Injektionsbereich Nekrosen beobachtet werden. Im Vergleich zu SELYE's Ergebnissen fällt auf, daß trotz der höheren Dosierung die Plaques kaum den Umfang wie bei ihm erreicht haben. Andererseits ist $CeCl_3$ der einzige Stoff dieser Gruppe, bei dem immerhin die mittlere Verdünnung auch gut wirksam war. Bei zwei Tieren waren zu Beginn der Versuche mit der Dosierung von SELYE ähnlich starke Effekte wie bei diesem erreicht worden. Jedoch ist zwischen Dosis und Umfang der Veränderung bei so kleiner Tierzahl noch keine Relation zu erwarten.

Tabelle 10: Ceriumchlorid

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 4,8 mg (0,1m)	0,48 mg (0,01m)	0,048 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	200	130	6	♀	210	7
2	179	103	0	♀	250	7
3	239	0	0	♀	190	8
4	110	0	0	♀	190	7
5	250	59	0	♂	315	7
6	320	126	0	♀	190	7
7	638	200	0	♂	180	7
8	-	-	0	♂	210	7
9	-	-	0	♂	210	7
10	-	-	0	♀	145	7
11	-	-	0	♂	145	7
12	-	-	0	♀	110	7
	2 mg (1 %)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
13	325	50	0	♀	190	8
14	208	32	0	♂	180	8

- bedeutet: Keine Injektion mit dieser Dosis.

Histologische Veränderungen bei den Seltenen Erden

Während beim Lanthanchlorid, wo die makroskopischen Befunde etwa ähnlich wie beim Indiumchlorid waren, in der Subkutis zum Teil bündelweise angeordnete, verkalkte kollagene Fibrillen angetroffen wurden, konnten wir beim $InCl_3$ nichts dergleichen feststellen. Die Färbung mit H.E. ergab beim Lanthan eine starke Zellinfiltration in der Subkutis, bestehend aus Lymphozyten, Histiozyten und vereinzelt gelapptkernigen Leukozyten. Im Bereich der zellulären Infiltration waren die kollagenen Bindegewebsfasern deutlich vermehrt. Auch beim Indiumchlorid trafen wir auf eine massive zellige Infiltration, welche jedoch hauptsächlich aus Leukozyten bestand. Nach Injektion von Ceriumchlorid zeigten einzelne Faserzüge des Subkutangewebes deutliche Verkalkung. Eine sehr starke Zellinfiltration, bestehend aus Leukozyten und Rundzellen, umgab einen Hohlraum, in dem noch vereinzelt Gewebsreste zu finden waren.

6. Calciumverbindungen

Die Salze des Calciums besitzen für die Fragestellung dieser Arbeit besonderes Interesse, weil anorganische Calciumverbindungen zur Pulpenüberkappung klinisch bevorzugt werden. Das gilt besonders von dem durch HERMANN [12] in die endodontische Therapie eingeführten Calxyl®, das in Form eines wässrigen Breis von Calciumhydroxyd als "Wundverband" der eröffneten Pulpa unmittelbar (sogenannte direkte Überkappung) oder unter Belassung einer dünnen Dentindecke (indirekte Überkappung) mittelbar aufgelegt wird. Wie in der Einleitung erwähnt, ist dabei bis heute die Vorstellung maßgebend, daß durch die örtliche Zufuhr von Calciumionen die Hartsubstanzbildung, die mit einer Kalkeinlagerung in das narbige Bindegewebe beginnt und mit der Apposition von Sekundärdentin durch Odontoblastentätigkeit abgeschlossen wird, gefördert wird, wenn nicht diese Calciumapplikation sogar Voraussetzung der Hartsubstanzbildung ist.

Als sich angesichts des hohen pH-Wertes von $Ca(OH)_2$ (12,3) die Behauptung des Erfinders von der "biologischen" Wirkungsweise der Substanz nicht aufrecht erhalten ließ, lag die Vermutung nahe, daß gerade in seiner Ätzwirkung, d. h. in der Erzeugung einer nekrotischen Matrix eine möglicherweise unerläßliche Voraussetzung für die Kalkeinlagerung liege. Die Sonderstellung des Calciumhydroxyds in der Therapie wäre also dadurch bedingt, daß es zugleich Lieferant für Calciumionen, wie auch Ätzmittel von begrenzter Tiefenwirkung ist. Die scharfe Begrenzung der Nekrose, die an der Pulpa stets zu sehen ist, dürfte, im Gegensatz zur Kolliquationsnekrose, die man an anderen Organen nach Laugenätzung kennt, auf der starken Durchblutung der Pulpa beruhen, die zu einer Ausfällung von $CaCO_3$ dort führt, wo das Löslichkeitsprodukt - entsprechend dem

Kohlensäure-Partialdruck des Blutes - überschritten wird. Sofern diese Anschauung gerechtfertigt ist, müßte erwartet werden, daß $Ca(OH)_2$, auch in andere Gewebe injiziert, zu einer dystrophischen Verkalkung führt, wie sich auch von EFFINGER [3] nach Injektion in die Milz von weißen Ratten festgestellt wurde. Andererseits haben die Versuche von SELYE den Glauben an die Notwendigkeit einer vorausgehenden Nekrose für das Zustandekommen einer Kalkablagerung in Frage gestellt. NaOH führt, wie SELYE hervorhebt, im Drei-Quaddel-Test an der Ratte jedenfalls nicht zur Verkalkung. Es war deshalb besonders interessant, wie sich Calciumhydroxyd verhalten würde. SELYE hat von Calciumsalzen nur das Chlorid und Acetat (jeweils 2 mg als Höchstmenge) geprüft, die nach seiner Tabelle zu den schwach wirksamen Verkalkungsstoffen zu rechnen sind.

Makroskopische Befunde bei Kalkverbindungen

In unseren Versuchen an zwölf Ratten zeigte sich Calciumchlorid in der vergleichbaren Höchstdosis (2,2 mg - 0,1-molar) siebenmal deutlich wirksam in dieser Konzentration, unwirksam in allen anderen Fällen und Verdünnungen, obwohl beim $CaCl_2$ wie aus der Therapie wohlbekannt, am ehesten mit einer örtlichen Nekrose, jedenfalls mit einer Reizwirkung zu rechnen ist.

Tabelle 11: Calciumchlorid

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 2,2 mg (0,1m)	0,22 mg (0,01m)	0,022 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	0	0	0	♀	300	7
2	0	0	0	♀	300	5
3	210	0	0	♀	130	7
4	14	0	0	♀	145	7
5	7	0	0	♂	195	7
6	0	0	0	♂	400	7
7	210	0	0	♀	175	7
8	90	0	0	♀	165	7
9	0	0	0	♀	190	8
10	0	0	0	♀	190	8
	2 mg (1 %)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
11	140	0	0	♂	225	8
12	5	0	0	♀	184	6

In äquimolarer Menge wurden von uns an leicht löslichen Salzen des Calciums außer dem Chlorid das Ca-Acetat und das Nitrat geprüft, die in der Hofmeisterreihe und demgemäß auch in Bezug auf lokale Reizung neben dem Chlorid und damit am "entquellenden Ende" der Reihe stehen. Wie die Tabellen 11 - 15 ergeben, waren sie ebenfalls nur sehr unsicher wirksam. Calciumacetat, von dem als Höchstmenge 3,2 mg injiziert wurden, war lediglich in 3 von 11 Fällen wirksam.

Tabelle 12: Calciumacetat

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 3,2 mg (0,1m)	0,32 mg (0,01m)	0,032 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	0	0	0	♀	250	7
2	0	0	0	♀	320	8
3	0	0	0	♀	190	8
4	172	0	0	♂	315	7
5	0	0	0	♀	190	7
6	0	0	0	♂	330	7
7	40	0	0	♂	430	7
8	0	0	0	♂	355	7
9	0	0	0	♂	440	7
10	0	0	0	○	220	7
	2 mg (1 %)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
11	40	0	0	♀	185	6

Die höchste Konzentration von Calciumnitrat (4,6 mg= 0,1-molar) vermochte bei 5 von 10 Ratten eine Verkalkung hervorzurufen (siehe Abb. 5).

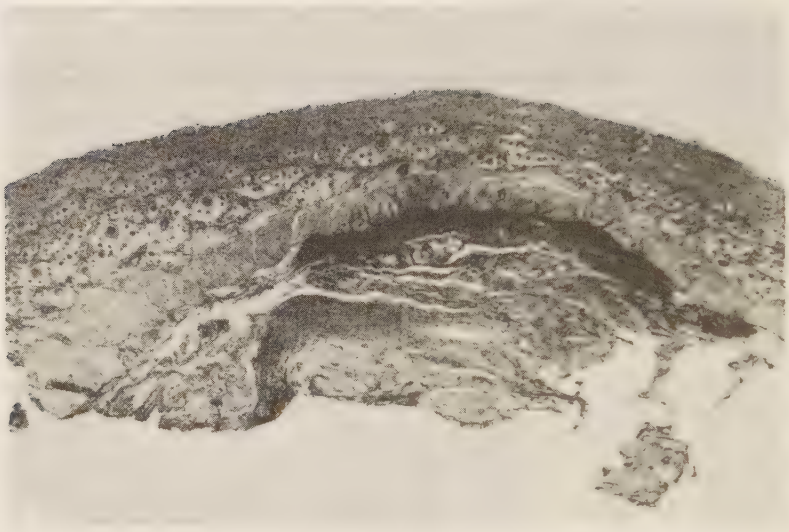

Abb. 5: Sehr intensive Kalkimprägnation der unter der Hautmuskelschicht gelegenen kollagenen Fasern nach Injektion von $Ca(NO_3)_2$.
Geringe ödematöse Verquellung in den tieferen Schichten der Subkutis.
Vergr. 18 x, Färbung nach v. KOSSA.

Tabelle 13: Calciumnitrat

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 4,7 mg (0,1m)	0,47 mg (0,01m)	0,047 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	0	0	0	♀	250	7
2	100	0	0	♀	210	7
3	0	0	0	♀	190	8
4	0	0	0	♀	190	7
5	105	0	0	♂	400	7
6	200	0	0	♀	145	7
7	0	0	0	♀	240	7
8	0	0	0	♂	365	7
9	180	0	0	♀	125	7
10	150	0	0	♀	160	7

Calciumhydroxyd, dessen Löslichkeit sehr gering ist, (1:650) mußte als Suspension, natürlich unter Verzicht auf einen kolloidalen Zusatzstoff, injiziert werden, was jedoch dank der guten Dispersität möglich war. Indessen traten bei den zwölf Ratten nur an sechs Tieren positive Reaktionen auf. Die größte derselben betraf eine Ratte, die maximal 2 mg (statt der äquimolaren 1,48 mg bei den anderen Tieren) erhalten hatte.

Tabelle 14: Calciumhydroxyd

Tier Nr.	Ausmaß der Verkalkungen in mm^2 nach Injektion der Dosen: 1,48 mg (0,1m)	0,148 mg (0,01m)	0,015 mg (0,001m)	Geschlecht	Gewicht	Tötung nach Tagen
1	0	0	0	♀	300	7
2	0	0	0	♀	300	5
3	0	0	0	♀	190	8
4	22	0	0	♂	400	7
5	0	0	0	♀	190	8
6	0	0	0	♂	460	7
7	18	0	0	♂	250	7
8	57	0	0	♂	280	7
9	39	0	0	♀	175	7
10	36	0	0	♂	160	7
	2 mg (1 %)	0,2 mg (0,1 %)	0,02 mg (0,01 %)			
11	129	24	0	♀	180	6
12	0	0	0	♀		7

Versuche mit Calciumsulfat

Die nach Sterilisation zur Verklumpung neigende Suspension konnte nicht injiziert werden. Statt der vorgesehenen isomolaren Höchstmenge von 3,4 mg wurde deshalb an 10 Tieren nur eine gesättigte Lösung (0,53 mg-0,016-molar) mit den entsprechenden Verdünnungen verwandt. Dabei traten keine Verkalkungseffekte auf.

Histologische Befunde

Im histologischen Präparat finden sich nach Injektion von Calciumchlorid verkalkte kollagene Fasern in der Subkutis, welche unmittelbar unter der Hautmuskelschicht parallel verlaufen und in den tieferen Schichten infolge seröser Verquellung des Subkutangewebes ungeordnet liegen. Außerdem treffen wir Rundzelleninfiltrate mit Histiozyten und Fibroblasten. Die Gefäße zeigen Hyperämie.

Die Injektion von Calciumacetat ergab im feingeweblichen Bild verkalkte kollagene Faserzüge, die in einem ödematös aufgequollenen Bezirk gelagert waren. Auch konnten wir eine starke Zellinfiltration beobachten.

Bei Calciumnitrat fanden wir eine massive Kalkeinlagerung in die kollagenen Faserzüge der Subkutis, wobei sich einzelne Ausläufer noch bis in die Hautmuskelschicht hinein erstreckten. Diese erschien über der Stelle der subkutanen Verkalkung atrophiert. Abgesehen von einer geringen serösen Aufquellung des Subkutangewebes trafen wir hier keine Zeichen von Entzündung.

Auch nach Applikation von Calciumhydroxyd konnten wir eine schmale Zone verkalkter Fasern beobachten, welche unmittelbar unter der Hautmuskelschicht gelegen war. Die Kalkeinlagerung geschah in Form feiner und feinster Körnchen (siehe Abb. 6), jedoch war hier nicht die Intensität wie bei Calciumnitrat zu erkennen. Stellenweise war das Gewebe ödematös aufgelockert und wies starke Rundzelleninfiltrate auf. Auch verschiedene kleinere Hämorrhagien waren aufgetreten (siehe Abb. 7).

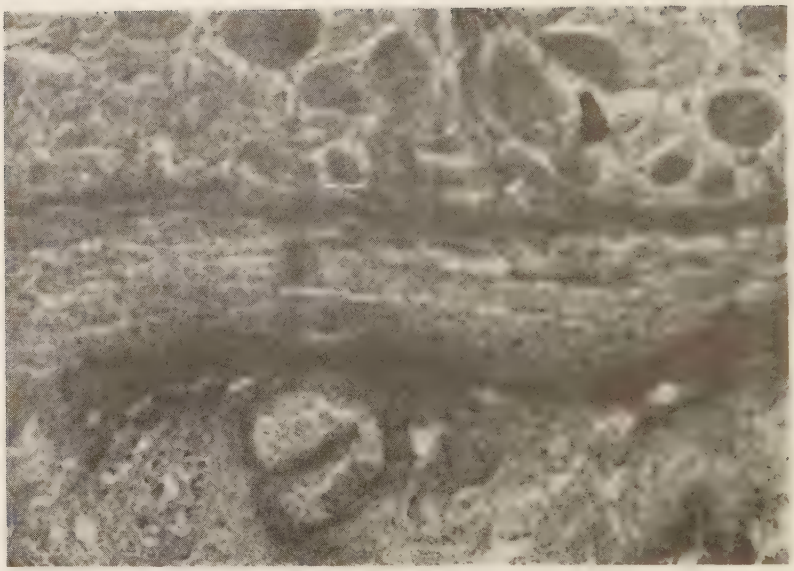

Abb. 6: Geringe Einlagerung von Kalk in die kollagenen Fasern der Subkutis nach Injektion von Calciumhydroxyd.

Vergr. ca. 200 x, Färbung nach v. KOSSA.

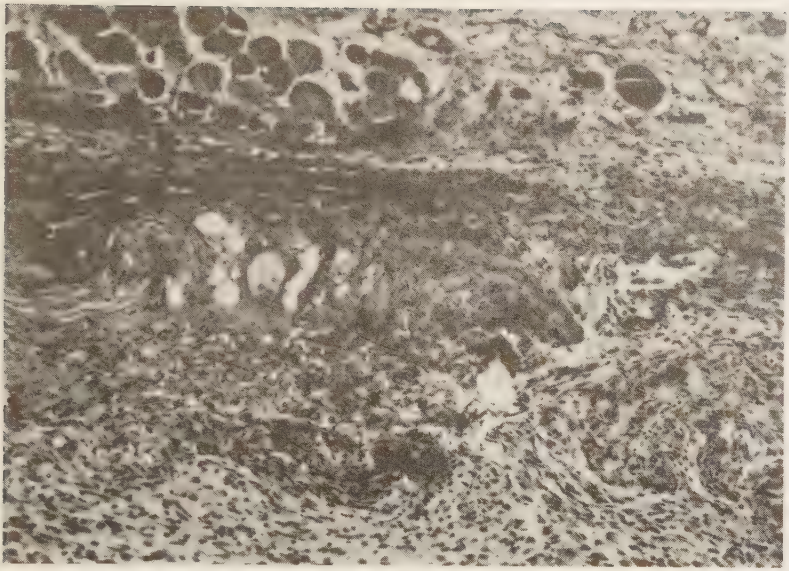

Abb. 7: Starke Rundzelleninfiltrate in der Subkutis als Zeichen von Entzündung nach Injektion von Calciumhydroxyd.

Vergr. ca. 100 x, H.E.-Färbung.

Es gehören also die Calciumsalze, seien sie leicht oder schwer löslich, mehr oder weniger reizend, zu den unsicher wirkenden Verkalkungsstoffen, so daß sie auf keinen Fall mit den im ersten Teil der Arbeit beschriebenen Metallsalzen z. B. mit denen des Bleis verglichen werden können.

B. STATISTISCHE AUSWERTUNG

Bei unseren statistischen Berechnungen, die wir nach der Bioassay-Methode nach D. I. FINNEY durchführten, fanden wir diesen Eindruck bestätigt. In folgendem führen wir eine Tabelle an, aus der die relative Wirkungsstärke der einzelnen Substanzen ersehen werden kann.

Tabelle 16:

Substanz	Wirksamkeit gegenüber Bleiacetat	mit 95 % Vertrauensgrenzen
Pb-Acetat	1,00	
$Pb(NO_3)_2$	1,13	0,41 - 3,14
$PbCl_2$	1,29	0,53 - 3,02
$Cu(NO_3)_2$	0,46	0,17 - 1,15
Cu-Acetat	0,37	0,11 - 1,30
$LaCl_3$	0,25x	0,083 - 0,67
$CeCl_3$	0,66	0,28 - 1,55
$KMnO_4$	1,28	0,35 - 4,83
$ZnCl_2$	0,083x	0,014 - 0,41
$Ca(NO_3)_2$	0,035x	0,0125 - 0,086
Ca-Acetat	0,011x	0,0027 - 0,037
$CaCl_2$	0,008x	0,0019 - 0,027
	0,027x	0,0094 - 0,067

Stab 1: Verkalkungsstoffe

Stab 2: Wirkungsverhältnis der geprüften Substanzen, bezogen auf Bleiacetat= 1,00; x = signifikant schwächer wirksam als Bleiacetat.

Stab 3: Vertrauensgrenzen (Spanne, in der sich mit 95 % Wahrscheinlichkeit die tatsächlichen Werte für das Wirkungsverhältnis bewegen). Stoffe, deren Vertrauensgrenzen den Wert 1 nicht erreichen, sind signifikant weniger wirksam als Bleiacetat.

Als Bezugssubstanz wählten wir Bleiacetat, dessen verkalkende Wirkung gleich 1 gesetzt wird. Soweit die in Stab 3 angegebenen Vertrauensgrenzen den Wert 1 nicht erreichen, bedeuten die in Stab 2 angeführten Verhältniszahlen für die Wirkung einen signifikanten Unterschied gegenüber Bleiacetat. Wo dies nicht der Fall ist, und die Vertrauensgrenzen den Wert 1 erreichen, sind die gefundenen Unterschiede gegenüber Bleiacetat nicht signifikant gesichert. Statistisch gesehen, lassen sich die untersuchten Stoffe somit in zwei Gruppen gliedern, wobei zur Gruppe der stark wirksamen Bleisalze und des Kaliumpermanganats auch die Salze des Kupfers nebst dem Ceriumchlorid gehören. In die zweite Gruppe mit gesichert schwächerer Wirkung gehören neben Zinkchlorid und Lanthanchlorid alle Verbindungen des Calciums, einschließlich des Calciumhydroxyds.

Polyäthylenglykol und Neomycinsulfat

Im Hinblick auf die Untersuchungen an Affenzähnen, die dieser Versuchsreihe folgen sollen, wurden Polyäthylenglykol 400, das als Salbengrundlage, und Neomycinsulfat 4 %, das als Infektionsschutz Verwendung finden sollte, jeweils subkutan injiziert. Es war bei keinem der beiden Stoffe zu entzündlichen Veränderungen oder zu Verkalkungen gekommen.

C. ANHANG

Versuche mit Zusatz von Triamcinolon

Anhangsweise sei eine Versuchsreihe erwähnt, bei der eine hohe Triamcinolondosis (4 mg), die die Tiere zwecks Unterdrückung des Entzündungseffektes erhalten sollten, jeder der sechs Quaddeln zugesetzt worden war. Es handelt sich also um eine extreme Dosierung, unter deren Einfluß 6 von 10 Tieren innerhalb 4 - 6 Tagen ad exitum kamen.

Vier Substanzen ($CaCl_2$, $Ca(OH)_2$, $CaSO_4$, Pb-Acetat) wurden zusammen mit Triamcinolon in 33%iger alkoholischer Lösung injiziert. Die späteren Versuche mit

$PbCl_2$	$Cu(NO_3)_2$	$CeCl_3$	$Ca(NO_3)_2$
Pb-Acetat	Cu-Acetat	$LaCl_3$	Ca-Acetat
$Pb(NO_3)_2$	$KMnO_4$	$InCl_3$	$Ca(OH)_2$

wurden mit Triamcinolon in Form einer wässrigen Suspension injiziert.

Tabelle 17:

	Ausmaß der Verkalkungen nach Injektion von je 0,2 ml der Testlösung + 0,1 ml einer 4%igen Triamcinolon-Lösung						
	0,1 m	0,01 m	0,001 m	Geschlecht	Gewicht	Töt. n. Tg.	
$Pb(NO_3)_2$	238	89	10	♀	210	6	†
$Ca(OH)_2$	35	35	25	♀	210	6	
$Pb(NO_3)_2$	321	200	30	♀	200	5	
$Ca(OH)_2$	21	20	6	♀	200	5	
$Cu(NO_3)_2$	645	80	2	♀	200	4	
$Ca(NO_3)_2$	33	33	38	♀	200	4	
Cu-Acetat	543	162	0	♂	300	6	
$InCl_3$	0	0	11	♂	300	6	
Ca-Acetat	31	21	11	♀	200	6	
$LaCl_3$	16x	25	2	♀	200	6	
$CeCl_3$	330	73	7	♀	200	6	
Pb-Acetat	218	96	18	♀	200	6	
$KMnO_4$	0	10	7	♂	300	6	†
$PbCl_2$	211	76	0	♂	300	6	
$CaSO_4$	10	10	0	♀	210	6	
$CaCl_2$	170	4	0	♀	210	6	

x Die weiße Quaddel war von einem trüben Hof umgeben; Gesamtfläche 167 mm.

Drei Ratten wurde Triamcinolin allein in der gleichen Menge, und zwar einmal i.m. die gesamte Dosis an einer Stelle, sowie zweimal subkutan, jeweils auf sechs Stellen verteilt, injiziert.

Tabelle 18: Verkalkungen nach Injektion von Triamcinolon-Acetonid

1. subkutan an sechs Stellen:			
15; 10; 0; 0; 0; 0;	♂	450 g	7 Tage
0; 8; 10; 6; 9; 11;	♂	210 g	4 Tage +
2. intramuskulär an einer Stelle: o. B.			

Im Vergleich zu den Versuchen ohne Triamcinolon fällt bei Betrachtung der Tabelle 17 auf, daß, abgesehen von Indiumchlorid, das auch hier nicht zu typischer Verkalkung führte, alle geprüften Substanzen auch in der mittleren, ja sogar meist noch in der stärksten Verdünnung wirksam waren. Im Ganzen waren also die Ergebnisse eher gleichmäßiger und quantitativ mindestens ebenso stark wie ohne Kortikoid.

Unter Kupferacetat und -nitrat traten bei den hohen Konzentrationen unter Triamcinolonzusatz sogar die weitaus stärksten, überhaupt beobachteten Verkalkungen auf. Auch bei mittlerer und zum Teil schwächster Dosierung war hier die Verkalkung verstärkt. Die ganze Gruppe der Seltenen Erden bleibt dagegen innerhalb des Gewohnten. Bei den Calciumsalzen wurden schwache und mittlere Konzentrationen in den Bereich einer, wenn auch mäßigen Wirksamkeit gehoben. Sogar bei $CaSO_4$, wo bisher in ca. 0,01-molarer Lösung keine Verkalkung beobachtet worden war, zeigten sich weiße Plaques.

Histologisch konnte festgestellt werden, daß die Entzündungserscheinungen erwartungsgemäß stark unterdrückt waren, meist sogar völlig fehlten. Als Ausdruck einer fehlenden Bindegewebsreaktion sahen wir die für hohe Triamcinolon-Konzentrationen typischen Anzeichen von Atrophie bis Nekrose: Abnahme der Zellkernzahl mit verminderter Färbbarkeit in allen Schichten der Haut, besonders in der Subkutis; Aufquellung der Muskelfasern der Hautmuskelschicht; Nekrosen in der Subkutis mit Untergang der elastischen und kollagenen Fibrillen. Meist stellten wir auch histologisch

eine Verstärkung der Verkalkungsintensität fest (Abb. 8).

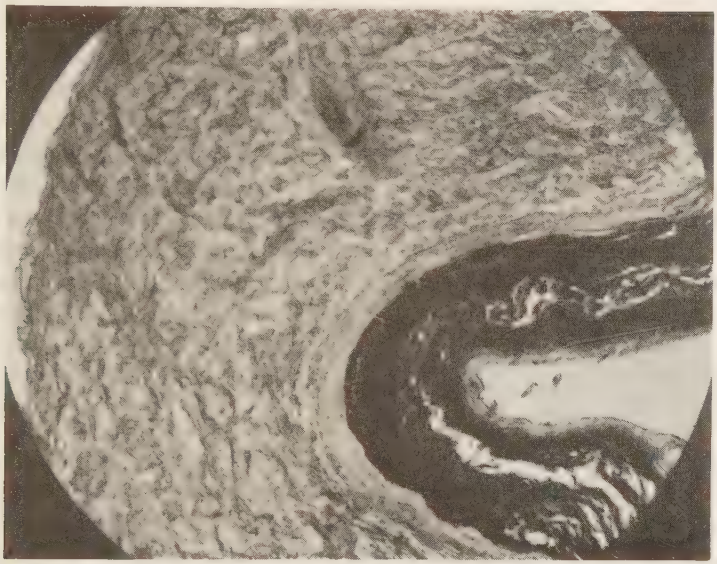

Abb. 8: Verstärkung der Kalkeinlagerung bei Calciumchlorid mit Zusatz von Triamcinolon-Acetonid.

Vergr. 84 x, Färbung nach v. KOSSA.

Man ist versucht, dieses Ergebnis mit der Erfahrung in Zusammenhang zu bringen, daß Prednisongaben eine Erhöhung der komplexen Calciumfraktion bewirken und dadurch vermehrt Transportcalcium zur Verfügung gestellt wird (HARNAPP [10]). Bezüglich des Serumcalciums verhält sich also das Kortikoid synergistisch zum Vitamin D, das nach SELYE als Prototyp des "sensitizers" bei der Calciphylaxie wirkt.

IV. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

Wir kommen zu der vom zahnärztlichen Standpunkt aus überraschenden Feststellung, daß Calciumsalze nach direkter Applikation im Drei-Quaddel-Test von SELYE , wie dieser selbst schon fand, keineswegs zu den stärksten, eher zu den schwächsten Verkalkungsstoffen gehören, eine Feststellung, von der das hier erstmalig untersuchte Calciumhydroxyd, dem zahnärztlicherseits eine besonders verkalkungsfördernde Wirkung auf die Pulpa zugeschrieben wird, keine Ausnahme macht. Daß nicht das exogen zugeführte Calcium, sondern das Calcium des Organismus bzw. das des Blutes herangezogen wird, ist unzweifelhaft, da verschiedene kalkfreie Verbindungen, wie aus SELYE's, von uns im wesentlichen bestätigten Versuchen folgt, bei örtlicher Applikation z. T. viel stärker verkalkend wirken. Wie wir auf Seite 13 ausführten, war dies von Bleisalzen (metallisches Blei war bekanntlich das älteste Füllungsmaterial für "Plomben") schon lange vor SELYE bekannt (14, 15).

Ein Vergleich mit den Untersuchungen von SELYE ist nicht ohne weiteres möglich, da wir, um zu einer eindeutigen Feststellung der relativen Wirkungsstärken zu gelangen, im Gegensatz zu diesem nicht gleichprozentige, sondern isomolare Mengen der Testsubstanzen geprüft haben. Unter Berücksichtigung dessen kann immerhin folgende Gegenüberstellung angebracht werden:

Die Bleisalze erzeugten in unseren Versuchen etwa gleich große Verkalkungen wie bei SELYE, wobei dem Bleichlorid, das wir nur in 0,035-molarer Lösung, also etwa in der SELYE'schen Dosierung, anwandten, mindestens die gleiche Wirkung zukam wie den isomolar und damit dreimal höher dosierten, löslicheren Bleisalzen. Es ist gleichsam das klassische Beispiel für Calcergie.

Kaliumpermanganat, welches sich schon bei SELYE als einer der stärksten calcifier erwies, erbrachte entsprechend der höheren Dosis in unseren Versuchen noch größere Plaques.

Kupfersalze ergaben sehr viel höhere Werte als die höhere Dosierung hätte erwarten lassen.

Von den Seltenen Erden fielen $LaCl_3$ und $InCl_3$, die bei SELYE klassische Plaques erzeugt hatten, ganz aus der Reihe, insofern als sie statt umschriebene Verkalkungen nur diffuse Trübungen der Subkutis ergaben. Während das der gleichen Gruppe zugehörige $CeCl_3$ sich durch eindeutige Verkalkungen auszeichnete, die ihrem Umfang nach über denen des Kupfers lagen bei einer Dosis, die etwa das Doppelte der SELYE'schen betrug. Dieses widersprüchliche Verhalten der Seltenen Erden könnte möglicherweise mit ihrem eigenartigen Fällungsvermögen zusammenhängen, das nach älteren Versuchen nicht proportional der Konzentration ansteigt. So wäre es denkbar, daß bei einem potentiellen Ver-

kalkungsstoff die Kalkspeicherung ausbleibt, wenn gleichzeitig die Blutzufuhr - als Voraussetzung für die Kalkanlieferung - in einem noch weiteren Bereich in Mitleidenschaft gezogen wird.

Zinkchlorid, das in der SELYE-Reihe zu den mittelstarken calcifiern gehört, war bei uns in vergleichbarer Dosis angewandt nur schwach verkalkend, während bei diesem typischen Ätzmittel verständlicherweise die gewebsreizende Wirkung im Vordergrund stand.

Die Calciumsalze zeigten sämtlich ebenso wie bei SELYE nicht regelmässig und nur unbedeutende Verkalkung. Besonders wichtig war für uns der Befund, daß davon auch das Calciumhydroxyd keine Ausnahme machte, sodaß auch dieses an der Pulpa bisher weit wirksamste "Verkalkungsmittel" in der SELYE'schen Anordnung fast zu den schwächst wirksamen calcifiern gehört.

Entgegen den Beobachtungen SELYE's kommen wir auf Grund unserer histologischen Untersuchungen mit H. E. -Färbung zu der Feststellung, daß praktisch alle untersuchten Stoffe in den wirksamen Konzentrationen auch zu einer mehr oder weniger starken Gewebsschädigung führten. Dies äußerte sich teils in nur mikroskopisch feststellbaren Zeichen von Entzündungen, teils in schon äußerlich sichtbaren Rötungen oder Nekrosen.

In Orientierungsversuchen mit örtlichem Zusatz von allerdings sehr hohen Dosen von Triamcinolon wurden diese Entzündungserscheinungen zwar unterdrückt, auf Grund der starken resorptiven Wirkung des Kortikosteroids kam es aber wohl sicher infolge seiner bekannten calcium-mobilisierenden Wirkung sogar zu einer deutlichen Verstärkung der örtlichen Verkalkung.

Nach alledem können wir uns nicht der Auffassung von SELYE anschließen, derzufolge bestimmte Stoffe auch ohne jede Gewebsschädigung zur Verkalkung führen, wenn auch zuzugeben ist, daß sicher nicht jede Gewebsschädigung zur Verkalkung führt. Der Begriff der "Dystrophischen Verkalkung" scheint uns also keineswegs überholt, zumal wir heute wissen, daß die mikroskopisch sichtbaren Gewebsveränderungen nur das Endstadium örtlicher Stoffwechselstörungen sind, die sich nur mit subtileren, insbesondere biochemischen und physikochemischen Methoden nachweisen lassen. Es sei hier nur auf die einschlägigen Veröffentlichungen von G. SEIFERT [20] hingewiesen, der in der Kalkspeicherung den Ausdruck eines aktiven Vorgangs auf der Grundlage einer primär biochemischen Funktionsänderung erblickt. Lichtmikroskopisch faßbare Gewebsveränderungen (Dystrophie bis Nekrose) gehören also nach heutiger Auffassung einem Endstadium an, dessen Fehlen feinere Gewebsstörungen auf der molekularen Ebene keineswegs ausschließt. Schon SELYE meinte, daß die Erscheinungen der Calcergie den Eindruck erwecken, als habe das beeinflußte Gewebe die Eigenschaft einer "Kalkfalle" angenommen, eine Bezeichnung, die er nur als eine deskrip-

tive Metapher verstanden wissen will.

Wie rasch es zu hochgradigen Verkalkungen absterbenden Gewebes ohne jede exogene Calciumzufuhr kommen kann, zeigen Versuche von MAJNO [17]. Die Verfasser entnahmen kleine Leberstückchen aus der intakten Leber von Ratten, die sie anschließend in die Peritonealhöhle von Empfängerratten transplantierten. Schon innerhalb der ersten zwei Stunden kam es zugleich mit anderen biochemischen Veränderungen (pH-Abfall und Fermentverluste) zu extremer Calciumspeicherung um mehrere 100 %, die in einer späteren Phase morphologisch manifester Schädigung infolge Diffusionsausgleichs wieder zurückging. Zur Erklärung des Wirkungsmechanismus ziehen die Verfasser eine Hypothese von UNGAR [25] heran, der den sprungartigen Anstieg der Calciumionen-Konzentration auf eine Eiweißdenaturierung zurückführt, bei der es zu einer Auffaltung von Polypeptidketten unter Sprengung zahlreicher Wasserstoffbrücken kommt, also zu einer sprunghaften Zunahme freier Nebenvalenzen, die durch Adsorbtion von Calcium abgesättigt werden.

Nach alledem erscheint uns also der alte Begriff der dystrophischen Verkalkung noch keineswegs entbehrlich, sondern nur einer Übersetzung in eine zeitgemäßere biochemische bzw. molekular-biologische Sprache bedürftig. Indessen zeigten unsere Versuche, daß nach einer Latenzzeit von 7 Tagen nach der Injektion gute wie schlechte calcifier stets auch histologisch erkennbare Gewebsveränderungen bewirkt hatten. Die Gegenüberstellung eines besonderen Begriffes der Calcergie im Gegensatz zur dystrophischen Verkalkung scheint uns also nicht gerechtfertigt. Daran ändert auch die Tatsache nichts, daß bei weitem nicht alle gewebsschädigenden Stoffe auch zur Verkalkungen führen. Wie das Beispiel des Calciumhydroxyds zeigt, ist die verkalkende Wirkung nicht allein durch die einwirkende Verbindung determiniert, sondern ebenso von dem biologischen Substrat und dessen feingeweblichen Besonderheiten abhängig.

Aus alledem folgt, daß die von uns festgestellte Reihenfolge in der Wirkungsstärke sogenannter calcifier für deren Prüfung an der Pulpa nur unverbindliche Hinweise liefern kann, wobei wir jedoch nicht erwarten dürfen, an diesem ganz andersartig strukturierten Organ, womöglich bei einer anderen Tierspezies, eine Analogie zu unseren Ergebnissen wiederzufinden. Trotzdem lohnt sich zweifellos ein solcher Versuch, da die bisher zur Pulpenüberkappung herangezogenen Mittel dringend der Ausweitung auf einen größeren Kreis von Substanzen bedürfen, auch wenn die der Auswahl zugrunde liegende Arbeitshypothese nachträglich sich als ungünstig erweisen sollte.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Es ist ein vordringliches Anliegen der konservierenden Zahnheilkunde, nach Eröffnung einer vitalen Pulpa einen Reparationsvorgang mit Verschluß des Defektes durch Sekundärdentin zu erreichen. Da dieser Vorgang mit Einlagerung von Kalk in das narbige Bindegewebe eingeleitet wird, kann die Zahnheilkunde nicht an gewissen neueren Arbeiten von SELYE vorbeigehen, in denen er unter dem Begriff der Calcergie eine Anzahl anorganischer Verbindungen beschreibt, die, in die Rattensubkutis injiziert, bereits in kleiner Dosis (0,02 - 2 mg) eine umschriebene Kalkeinlagerung in das kollagene Bindegewebe der Subkutis bewirken, ohne daß nach Ansicht SELYE's nennenswerte Entzündungserscheinungen auftreten.

Im Hinblick auf eine mögliche Verwendung zu Überkappungszwecken wurden die wirksamsten Stoffe an 115 Ratten im SELYE'schen Drei-Quaddel-Versuch geprüft und mit dem bisher klinisch bestwirksamen Überkappungsmittel Calciumhydroxyd verglichen.

Übereinstimmend mit SELYE bewirkten starke Kalkeinlagerung die Salze des Bleis (Chlorid>Nitrat>Acetat), des Kupfers (Nitrat>Acetat), Kaliumpermanganat und Cerchlorid, während Zinkchlorid und alle geprüften Kalksalze (Nitrat>Chlorid>Acetat>Sulfat) signifikant schwächer wirkten. Das hier erstmals untersuchte Calciumhydroxyd stand ebenfalls ziemlich am Ende dieser Reihe. Keine Plaques sondern diffuse Verkalkung zeigt Lanthanchlorid, während Indiumchlorid überhaupt nur eine diffuse Trübung aufwies.

Nicht in Einklang zu bringen mit SELYE's Definition der Calcergie war der regelmäßige Befund mehr oder weniger starker entzündlicher Erscheinungen bei fast allen Verkalkungsstoffen im mikroskopischen Bild, so daß uns die Einführung dieses Begriffes nicht gerechtfertigt erscheint. Der mögliche Wirkungsmechanismus örtlicher Calcinosen im Sinne einer modernen Interpretation dystrophischer Verkalkung wird diskutiert.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1 AJAZZI-Mancini, N.: Arch. Fisiol. 24, 162; 1926

2 BUCK, J.S.:
KUMRO, L.M.: J. Pharmacol. 38, 161; 1930

3 EFFINGER, A.: Histologische Studien über die lokale Reaktion des Milzgewebes weißer Ratten nach Implantation von zahnärztlichen Füllmaterialien. Dtsch. zahnärztl. Z. 7, 97; 1953

4 EICHHOLTZ, F.: in Heffter-Heubner:
Handbuch der exper. Pharmacol. III/3, 1928
1934

5 EICHHOLTZ, F.: in Heffter-Heubner:
Handbuch der exper. Pharmacol. III/3, 1910;
1934

6 FLURY, F.: in Heffter-Heubner:
Handbuch der exper. Pharmacol. III/3, 1575;
1934

7 HAHN, F.:
SCHUNK, R.: Arch. exper. Path. u. Pharm. 226, 424, 1955

8 HARA, S.: Arch. exper. Path. 100, 217; 1923

9 HARNACK, E.: Arch. exper. Path. u. Pharm. 46, 372; 1901

10 HARNAPP, G.O.: Zur Wirkung von Vitamin D und Prednison auf das Körpercalcium
Arch. Kinderkh. 174, 112 - 121; 1966 (Kinderklinik der Med. Akad. Dresden)

11 HAUSCHILD, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie
VEB Thieme, Leipzig 1960

12 HERMANN, B. W.: Calxyl ätzt doch nicht.
Zahnärztl. Welt 5, 646; 1950

13 HESSE, E.: in Heffter-Heubner:
Handbuch der exper. Pharmacol. III/3, 2186;
1934

14 v. KOSSA, J.: Beitr. path. Anat. und allgem. Path. 29, 163; 1901

15 KUMITA; Virchows Archiv 198, 401; 1909

16 LANGECKER, H.: in Heffter-Heubner: Handbuch der exper. Pharmacol. III/2, 1391; 1934

17 MAJNO, G.: "Death of liver tissue" aus "The Liver" Band 2, Ch. Rouiller, New York und London 1964

18 MUNTSCH: Arch. exper. Path. u. Pharm. 101, 545; 1931

19 SAUERWEIN, E.: Untersuchungen zur Frage der Ätzwirkung des Calxyls. Zahnärztl. Welt 6, 120; 1951

20 SEIFERT, G.: Die Calciphylaxie als pathogenetischer Faktor. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft f. Innere Medizin, 71. Kongreß, München 1965

21 SELYE, H.: Calciphylaxis. The University of Chicago Press, 1962

22 SELYE, H.: TUCHWEBER, B.: PADMANABHAN, B.: Über direkt wirkende Verkalkungsstoffe. Arzneimittelforsch. 13, 429; 1963

23 SELYE, H.: TUCHWEBER, B.: GABBIANI, G.: Naunyn-Schmiedbergs Arch. 244, 109; 1962

24 STEIDLE, H.: in Heffter-Heubner: Handbuch der exper. Pharm. III/4, 2189; 1935

25 UNGAR, G.: ASCHHEIM, E.: PSYCHOYOS, S.: ROMANO, D. V.: Reversible changes of protein configuration in stimulated nerve structures. J. Gen. Physiol. 40, 635 - 652; 1957

Herrn Professor R. von WERZ möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas sowie für die allzeit gewährte pharmakologische Beratung und Förderung herzlich danken.

Herrn Professor A. SCHROEDER und Herrn Privatdozent Dr. H. TRIADAN (Bern) gilt mein Dank dafür, daß ich meine Untersuchungen am dortigen vorbildlich eingerichteten Zahnärztlichen Institut der Universität fortsetzen und abschließen durfte. Fräulein E. ZESIGER und Fräulein WELTEN danke ich für die am dortigen Institut ausgeführten histologischen und fotografischen Arbeiten.

Herrn Dr. JESDZINSKI vom Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation in Freiburg danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung.

LEBENSLAUF

Am 15. September 1940 wurde ich als Tochter des Arztes Dr. Hugo Kuhn und seiner Frau Dr. Ruth Kuhn, geb. Blanke in Forst/Lausitz geboren.

Von 1946 bis 1950 besuchte ich die Volksschule in Friesenheim/Baden und trat dann in das Humanistische Gymnasium in Lahr ein. Dort legte ich im Frühjahr 1959 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1959 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg. Nach der am 15.4.1962 bestandenen Zahnärztlichen Vorprüfung setzte ich mein Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München fort und erhielt am 9. März 1965 die Approbation als Zahnärztin.

Nach kurzer zahnärztlicher Tätigkeit in der Schweiz begann ich am 15.10.1965 an der Zahnklinik der Universität Freiburg mit der Fachausbildung für Kieferorthopädie.

Im Oktober 1966 heiratete ich den Zahnarzt Ludwig Bauer aus Eichstätt/Bayern.